WIRKUNGEN VON TABAKRAUCH UND NIKOTIN AUF DIE LIPOLYTISCHE AKTIVITÄT VON SÄUGETIERORGANEN

Hildegard Pabst

1979

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535722_0074

AUS DEM INSTITUT FÜR KLINISCHE CHEMIE
DEUTSCHES HERZZENTRUM DES FREISTAATES BAYERN
(Direktor: Professor Dr. H. Schievelbein)

WIRKUNGEN VON TABAKRAUCH UND NIKOTIN AUF DIE LIPOLYTISCHE AKTIVITÄT VON SÄUGETIERORGANEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hildegard Pabst geb. Gindele
aus München

München 1979

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter	: Prof. Dr. H. Schievelbein
Mitberichterstatter	: Prof. Dr. M. Knedel
Dekan	: Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung	: 17.7.1979

UNIV. LEIDEN BIBL.

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meiner lieben Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINFÜHRUNG UND ÜBERSICHT	1
II. PROBLEMSTELLUNG	6
III. MATERIAL UND METHODIK	7
1. Material	7
a. Gewinnung von Post-Heparin-Plasma bei Ratten	7
b. Gewinnung von Post-Heparin-Plasma bei Kaninchen	7
c. Organgewinnung und Homogenatherstellung	8
d. Herstellung von Substrat	9
2. Messung der LPA	10
a. Versuchsansatz nach Londong	10
b. Bestimmungsmethoden der LPA	10
1. Methode nach Dole	11
2. Methode nach Burns	11
3. Glycerinmessung nach Boehringer-Test	11
c. Berechnung der LPA in Plasma und Gewebe	12
d. Proteinbestimmung	12
IV. ERGEBNISSE	13
1. Überprüfung der Methodik	13
a. Einfluß von Nembutal^{R}	13
b. Einfluß von Polyvinylalkohol	13
c. Prüfung der Eigenschaften der LPA	13
2. LPA in Organen	15
3. Untersuchungen der LPA bei Nikotinzufuhr	16
a. Wirkung von Nikotin auf die Enzyme der Glycerin-Bestimmungsmethode	16
1. Ansatz mit Nikotin und Palminsubstrat	16
2. Ansatz mit Nikotin und Glycerinlösung	16
b. In vitro-Versuch mit Organen von Ratten und Kaninchen	16
4. Untersuchung der LPA nach Berauchung	17
a. Wirkung von Tabakrauch auf die Enzyme der Glycerin-Bestimmungsmethode	17

Seite

IV. 4. b. Berauchen in vitro von Organhomogenaten von Kaninchen 18

c. Berauchen in vivo 18

5. Messungen der LPA bei Nikotinzufuhr in vitro 19

a. pH-Optimum der Reaktion 19

b. Verhalten von Nikotin zu Enzymen der Glycerinbestimmung 20

c. Dosisabhängigkeit von Nikotin in Lösungsmitteln am Kaninchenherz 20

d. LPA bei Kaninchenherzen 20

e. LPA bei Rattenleber 20

6. LPA-Messungen bei Berauchung in vitro 22

a. Verhalten von Tabakrauch zu den Enzymen der Glycerinbestimmung 22

b. LPA der Leber bei Berauchung 22

c. LPA des Herzens bei Berauchung 22

7. LPA-Messungen bei Berauchung in vivo 22

V. DISKUSSION 26

VI. ZUSAMMENFASSUNG 29

VII. LITERATURVERZEICHNIS 31

I. EINFÜHRUNG UND ÜBERSICHT

Herz-Kreislauferkrankungen stehen in vielen Ländern an erster Stelle in der Statistik der Todesursachen mit ständig steigender Tendenz der Mortalitätsziffer. Besonders eindrucksvoll ist diese Entwicklung in Deutschland, wo sich die Zahl der Herzinfarkte seit 1956 verdreifacht hat. Als Ursache dafür vermutet man Änderungen der Lebensgewohnheiten (1), von denen vor allem eine unphysiologische Lebensweise mit Überernährung, gesteigertem Konsum tierischer Fette, chronischen Stressituationen, Bewegungsarmut und Nikotinabusus diskutiert werden. Seit Durchführung der Framingham-Studie (2, 3) hat Rauchen als Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose bzw. Koronarsklerose an Bedeutung gewonnen. Eine ihrer wesentlichen Aussagen war, daß Zigarettenraucher ein zwei- bis dreimal größeres Risiko tragen, einen Herzinfarkt zu erleiden, als Nichtraucher, Zigarren- oder Pfeifenraucher. GSELL (4) zieht in seinem Übersichtsreferat über die bisher vorliegenden epidemiologischen, retrospektiven und prospektiven Statistiken die Schlußfolgerung, daß eine eindeutige Beziehung zwischen Tabakrauchen und Herzinfarkt sowie der Mortalität an Koronarerkrankungen besteht. Besonders im jüngeren und mittleren Lebensalter ist chronisch stärkeres Rauchen als Risikofaktor des Herzinfarktes zu betrachten.

Eine Vielzahl wechselnder Theorien haben die von einer Intimaläsion ausgehenden pathogenetischen Vorstellungen der allgemeinen Arteriosklerose und damit auch der Koronarsklerose komplizierter gemacht, jedoch nicht erklärt. Aus der Anzahl der Theorien, die auf einer Störung des Fettstoffwechsels basieren (5), ist unschwer zu erkennen, daß den Lipoiden eine zentrale Bedeutung zukommt. Dafür sprechen auch die Erkrankungen, die als sichere Risikofaktoren der Arteriosklerose gelten - Diabetes mellitus, Hyperlipämie, Hypothyreose, Adipositas, Gicht und arterielle Hypertonie.

Die Ätiologie der Arteriosklerose wird seit längerem mit einem gestörten Fettstoffwechsel in Zusammenhang gebracht. Rauchen und - von den meisten Untersuchern unterstellt - Nikotin könnte über eine Störung des Fettstoffwechsels Einfluß auf die Entstehung einer Koronarsklerose ausüben. Untersuchungen darüber bei Menschen fielen sehr unterschiedlich aus; so finden sich widersprüchliche Aussagen über die Konzentration von Cholesterin bei Rauchern und Nichtrauchern, eine fast einheitliche Aussage hinsichtlich einer Erhöhung der Lipoproteidkonzentration im Blut. Ein Unterschied in der Konzentration der Triglyzeride bei Rauchern im Verhältnis zu Nichtrauchern wurde nicht beobachtet, in einigen Fällen jedoch ein Abfall der Konzentration der Triglyzeride nach dem Rauchen.

Nikotin wurde, als pharmakologisch sehr aktiver Bestandteil des Tabakrauches, als kausaler Faktor für diese Veränderung verantwortlich gemacht. Nikotin hat neben den verschiedenen pharmakologischen Wirkungen auf Herz und Kreislauf (periphere Vasokonstriktion mit Blutdrucksteigerung, Koronarerweiterung mit erhöhter O_2-Utilisation) Einfluß auf das Blutgerinnungssystem einerseits durch Förderung der Thrombozytenaggregation (6), andererseits durch Verkürzung der Gerinnungszeit (7, 8). Eine Intimaschädigung durch Nikotin (9) und Tabakrauch (10) wurde mikroskopisch bzw. elektronenoptisch beobachtet. Von größter Bedeutung im Zusammenhang mit der Genese der Koronarsklerose scheint aber die Stoffwechselwirkung des Nikotins zu sein, die auf einer Aktivierung der Glykolyse und Lipolyse beruht (11, 12, 13). Zu dieser Kenntnis führten u.a. die Arbeiten von KERSHBAUM u. Mitarb. (12), die 1961 erstmals berichteten, daß Zigarettenrauchen beim Menschen zu einer Erhöhung der freien Fettsäuren (FFS) im Blut führt. Tierexperimentell konnten sie bei Hunden durch Nikotininfusion den gleichen Effekt erzielen. Später wiesen die gleichen Autoren (13, 14) darüberhinaus beim Menschen nach Rauchen und bei Hunden nach Nikotininfusionen eine vermehrte Katecholaminausscheidung im Urin nach. Heute gilt eine lipolytische Wirkung des Nikotins über die sympathoadrenale Sti-

mulierung als gesichert (11, 15, 16, 17).

Der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus beruht wie bei allen lipolytischen Hormonen auf der Aktivierung der Adenylcyclase, die aus ATP cyklisches AMP bildet, welches die inaktive Fettgewebslipase direkt aktiviert zur Spaltung von Triglyzerid in Diglyzerid und FFS (18). Insulin und Glukose gelten als physiologische Gegenregulatoren (19). Daraus erklärt sich der erhöhte FFS-Spiegel beim Insulin-Mangel und im Hunger (20).

Ob Nikotin weitere Störungen des Fettstoffwechsels verursacht, wurde von vielen Autoren untersucht. GOFMAN (21), KARVONEN (22), BRONTE-STEWART (23), THOMAS (24) und KANNEL (25) fanden bei Rauchern erhöhte Cholesterinwerte im Blut - allerdings übereinstimmend nur in der Altersgruppe von 20 bis 39 Jahren. WENZEL u. Mitarb. (26) beobachteten bei Kaninchen, die bei cholesterinreicher Ernährung Nikotin erhielten, signifikant erhöhte Werte.
Über das Verhalten der Lipoprotein-Lipasen des Blutes unter Nikotinkonsum liegen nur spärliche Ergebnisse vor. BECKER und NECHELES (27) fanden nach alimentärer Fettbelastung von rauchenden Koronarsklerotikern einen steilen Anstieg und einen verzögerten Abfall der Chylomikronen im Blut. Nach WHITE u. Mitarb. (28) hemmt Nikotin die durch Heparin stimulierbare Kläraktivität des Serums in vivo und in vitro bei Ratten. Bedeutungsvoll scheint in diesem Zusammenhang, daß Arteriosklerosekranke und alte Menschen einen Mangel an heparinähnlichen Substanzen und an Lipoprotein-Lipasen im Blut haben (29, 30).

Das Problem der experimentellen Arteriosklerose durch Nikotin wurde auf verschiedenste Weise untersucht. HASS u. Mitarb. (31) konnten nur durch die Dreierkombination Nikotin, cholesterinreiche Diät und Vitamin-D-Überdosierung Gefäßverkalkungen erzeugen, während die entsprechende Kontrollgruppe keinerlei pathologische Gefäßwandveränderungen erkennen ließ. Dagegen wiesen GROSGOGEAT und ROUBELAKIS (32) bei Kaninchen,

die zwei Monate lang täglich 2 x 15 mg Nikotin s.c. verabreicht bekamen, mikroskopisch und elektronenmikroskopisch Frühschäden an der Intima mit Mucopolysaccharidablagerungen und Spätschäden an der Media mit Nekroseherden und Kalkablagerungen nach. In einer anderen Studie untersuchten GROSGOGEAT u. Mitarb. (33) bei zusätzlicher cholesterinreicher Diät die Zusammensetzung der Blutlipide und der Lipide des Aortengewebes. Die makroskopisch unauffälligen Aorten zeigten mikroskopisch ein signifikant häufigeres Vorkommen einer Aortenfibrose. Der Gesamtlipid- und der Cholesteringehalt des Aortengewebes war in einigen Fällen erniedrigt. Der Gehalt an Cholesterin, α-Lipoprotein, ß-Lipoprotein, Triglyzerid und FFS im Blut war im wesentlichen normal.

Insgesamt waren die bisherigen Untersuchungen der experimentell induzierten Arteriosklerose durch Nikotin unbefriedigend. Das liegt u.a. daran, daß extrem hohe oder viel zu niedrige Nikotindosen appliziert wurden. Die Versuchsdauer war in den meisten Fällen relativ kurz und die Kombination mit anderen atherogenen Faktoren, wie cholesterinreicher Diät oder Vitamin D-Überdosierung, komplizierend.

Von der Arbeitsgruppe SCHIEVELBEIN wurde die Frage geprüft, ob Nikotin allein biochemische und morphologisch faßbare Veränderungen an einer Tierspezies hervorrufen könnte, die stark zur spontanen Ausbildung einer Arteriosklerose neigt. Dazu wurde ein Langzeitexperiment an Kaninchen durchgeführt.

Die Versuchstiere erhielten 20 Monate lang 1,14 mg/kg Nikotin 2 mal täglich per os unter Kontrolle des Nikotinspiegels im Blut. Während der Dauer des Experimentes wurde der Fettstoffwechsel überprüft. Im Blut der Tiere waren das Cholesterin, die Gesamtlipide, die veresterten Fettsäuren und die Phosphatide nach 12 Monaten erhöht, am Ende des Experimentes war die Konzentration dieser Fettstoffwechselmetabolite wieder gleich den Ausgangswerten. Dieser Altersgang ist signifikant, Unterschiede zwischen den nikotinbehandelten und den Kontroll-

tieren bestanden nicht.

Die Untersuchungen des Fettstoffwechsels am Ende des Experimentes ergaben folgende Befunde: Die FFS waren erhöht bei nikotinbehandelten Tieren in Leber und Aorta, der Neutralfettgehalt der Leber war erniedrigt. Die lipolytische Aktivität war erhöht in Herz und Aorta der behandelten Tiere. Der Calciumgehalt der Aorta der behandelten Tiere war gegenüber den Kontrollen signifikant erhöht. Histologisch konnten Veränderungen in den Koronarien und den Aorten der behandelten Tiere gefunden werden, die neben anderen pathologischen Befunden die Tendenz zur Ausbildung einer Arteriosklerose zeigten. Diese Veränderungen wurden jedoch in behandelten und unbehandelten Tieren in der gleichen Häufigkeit und im gleichen Ausmaß gefunden (34).

Es wurde aus diesen Ergebnissen der Schluß gezogen, daß Nikotin allein, auch in hoher Dosis, selbst bei einer für die Entwicklung einer Arteriosklerose sehr anfälligen Spezies, keine degenerativen Gefäßveränderungen hervorrufen kann. Als zusätzlicher Faktor könnte jedoch eine derartige Wirkung erkennbar werden.

II. PROBLEMSTELLUNG

Bei den oben erwähnten Ergebnissen war besonders auffällig, daß die lipolytische Aktivität (LPA) eine signifikante Erhöhung der Aktivität bei den nikotinbehandelten Tieren sowohl im Plasma als auch im Gewebe von Herz, Aorta und Leber zeigte. Dieser Befund steht im Einklang mit der theoretischen Nikotinwirkung über das Adenylcyclasesystem. Es ist heute bekannt, daß mehrere esterolytische Enzyme am Fettstoffwechsel beteiligt sind; so läßt sich eine lipolytische Aktivität in den Gefäßwänden und Fettgewebe nachweisen, die durch Heparingabe stimuliert werden und durch Protaminsulfat gehemmt werden kann und ein anderes System, das durch diese Substanzen nicht beeinflußt wird (35). Der Heparin-induzierten Lipoprotein-Lipase (HPL) kommt möglicherweise die größere Bedeutung für die Entstehung der Hyperlipämie zu (z.B. Typ I der Hyperlipämie nach Frederickson).

Bei der vorliegenden Arbeit sollte jedoch ganz allgemein die lipolytische Aktivität geprüft werden, ohne Zuordnung zu einem bestimmten Enzym, da im Wesentlichen zwischen der Nikotinwirkung und der Tabakrauchwirkung unterschieden werden sollte. Außerdem war es aus technischen Gründen nicht möglich, die Aktivität einzelner Enzyme voneinander zu trennen.

III. MATERIAL UND METHODIK

III.1. Material

III.1.a. Gewinnung von Post-Heparin-Plasma bei Ratten

Es wurden weiße männliche Ratten mittleren Alters mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 300 g ± 30 g verwendet, die ständig mit Standardnahrung ernährt worden waren.
Die Versuchstiere wurden mit Pentobarbital-Natrium (Nembutal^{R}) intraperitoneal narkotisiert.
Die Heparinmengen lagen bei 5 - 6 IE Heparin/100 g Körpergewicht. Bei den Versuchen wurde Vetren^{R} verwendet, wobei 1 ml Vetren^{R} 100 IE Heparin entspricht.
Die Arteria carotis communis dextra wurde freipräpariert, ein Katheter eingeführt und die entsprechende Menge Heparin gespritzt. 10 Minuten nach der Heparinisierung wurde Blut über den Katheter entnommen und in Polyvinyl-Zentrifugengläser gegeben. Diese wurden mit Parafilm verschlossen. Nach sofortiger rascher Abkühlung im Eisbad wurde daran anschließend bei 3000 Umdrehungen/min und bei +4 °C 10 Minuten lang zentrifugiert (36).
Das so gewonnene Post-Heparin-Plasma wurde abpipettiert und bis zur Messung der LPA in der Tiefkühltruhe bei -20 °C konserviert.

III.1.b. Gewinnung von Post-Heparin-Plasma bei Kaninchen

Als Versuchstiere wurden einjährige männliche Kaninchen verwendet. Die Tiere wurden seit mindestens 8 Tagen vor dem Versuch mit Standardfutter (Altrumin K) ernährt, um eine gleichbleibende LPA zu sichern. Einen Tag vor der Blutabnahme bekamen die Tiere kein Futter mehr.
Die Tiere wurden mit Nembutal^{R} intravenös narkotisiert.
10 Minuten nach der i.v.-Injektion von Vetren^{R} und bei vollständiger Nembutal-Narkose wurde aus der Arteria carotis über einen Katheter 5 ml Blut entnommen.

Das Blut wurde im Eisbad auf 4 °C abgekühlt und in Polyvinyl-Röhrchen bei 3000 Umdrehungen/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Das so gewonnene Post-Heparin-Plasma wurde ebenfalls in der Tiefkühltruhe bis zur Aufarbeitung konserviert.
Dieses Plasma diente für die vorbereitenden Versuche zur Methodik der LPA-Messung. Es wurde nicht für Nikotin-Versuche verwendet.

III.1.c. Organgewinnung und Homogenatherstellung

Es wurden sowohl die Organe von heparinisierten Ratten, bei denen bereits einmal Blut abgenommen wurde als auch Organe von nicht heparinisierten Ratten verwendet. Die Ratten wurden durch Dekapitierung ausgeblutet.
Sämtliche Kaninchenorgane stammten von nicht heparinisierten Tieren. Nach dem Entbluten wurden die Organe rasch entnommen, in gekühlter physiologischer Kochsalzlösung kurz gewaschen, auf Filterpapier getrocknet und so rasch als möglich eingefroren.
Am Herzen wurde das makroskopisch sichtbare Fett entfernt. Zur Herstellung des Extraktes wurde nur das Gewebe des linken Ventrikels benutzt; bei den Berauchungsversuchen wurden allerdings beide Ventrikel verwendet.
Die gesamte Aorta bis hin zur bifurcatio wurde von Fett und Bindegewebe freipräpariert, dann mit physiologischer Kochsalzlösung durchgespült und anschließend in flüssigen Stickstoff gehalten, um möglichst keine Strukturveränderungen zu erhalten (37).
Bei der Herstellung des Leberhomogenats wurde ein beliebiges Stück verwendet, nachdem es vorher von makroskopisch sichtbarem Fett befreit worden war.

Zur Homogenatherstellung wurden die tiefgefrorenen Organproben nach genauem Einwiegen in flüssigen Stickstoff gehalten, danach mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und im Ultra-Turrax unter ständiger Kühlung mittels Eiswasserbad mehrmals kurz homogenisiert.

Um ein möglichst gleichmäßiges Homogenat zu erhalten, wurden verschiedene Mengen von physiologischer Kochsalzlösung den Organen beigesetzt.
In Tabelle 1 sind die verschiedenen Verdünnungsfaktoren aufgezeigt.

Tabelle 1: Verdünnungsfaktoren bei der Homogenatherstellung von Ratten- und Kaninchenorganen

Organe	Ratten		Kaninchen
Leber	1:5	1:10	1:10
Herz	1:5	1:10	1: 6
Aorta	1:10	1:40	
Aortenpool	1:10		
Plasma	1:5		

Im Verlauf der Arbeit zeigte sich, daß eine Verdünnung von 1:10 bei allen Organen am günstigsten war.
Bei der Herstellung des Leberhomogenats wurde zum Teil auch scharf zentrifugiert bei 20000 Umdrehungen/min, 20 Minuten lang.
Die Homogenisierungszeit betrug bei Fett 30 Sekunden, bei Leber 35 - 60 Sekunden und bei Aorta 45 Sekunden; die Aorta wurde während des Homogenisierens mehrmals wieder in flüssigen Stickstoff gehalten.

Von allen Homogenaten wurden kleine Proben entnommen und in ihnen der Protein-Anteil mit Hilfe der Biuret-Reaktion durchgeführt, um die LPA auf Gramm Eiweiß beziehen zu können.

III.1.d. Herstellung von Substrat

Die größte Reaktionsgeschwindigkeit der LPA ergibt sich bei Verwendung von Kokosfett (38). Kokosfett wurde in Form von Palmin-Tafelfett bei den Versuchen verwendet.
Es wurde eine 1 %ige Emulsion in 1 % Polyvinylalkohol herge-

stellt. Die Emulgierung geschah im Ultra-Turrax unter ständiger Kühlung. Die Emulgierzeit betrug 3 Minuten, anschließend wurde zentrifugiert (5 Minuten lang bei 4000 Umdrehungen/min). Die Emulsion wurde unter der Fettschicht abpipettiert und für den Bestimmungsansatz verwendet.

III.2. Messung der LPA

III.2.a. Versuchsansatz nach LONDONG (39)

0,1 ml Plasma
0,4 ml 0,9 % NaCl-Lösung bzw. 0,5 ml Organhomogenat
0,1 ml 0,4 mol Trispuffer bei pH 8,2
1,0 ml 8 % Rinderalbumin in 0,9 % NaCl-Lösung bei pH 8,2
0,4 ml 1 % Palminsubstrat

Unter ständigem Schütteln im Wasserbad bei 37 °C wurde 60 Minuten lang inkubiert - die Reagenzgläser waren während der Inkubation offen -, anschließend wurde sofort die enzymatische Reaktion mit 0,1 ml 1n eisgekühlter Schwefelsäure unterbrochen (40), dann wurde 10 Minuten lang mechanisch weitergeschüttelt.
Beim enzymatischen Reaktionsablauf in den Organhomogenaten von Fett, Herz und Aorta wurde anschließend 10 Minuten lang bei 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert.
Zur Leerwertbestimmung wurde der gleiche Versuchsansatz verwendet, jedoch die Analysenprobe (Organhomogenat bzw. Plasma) erst nach dem Zusatz von 0,1 ml 1n H_2SO_4 zugegeben.

III.2.b. Bestimmungsmethoden der LPA

Im Prinzip werden unter Einwirkung der lipolytischen Aktivität an Eiweiß gebundene Triglyceride hydrolytisch gespalten. Als Reaktionsprodukte entstehen freie Fettsäuren, Glycerin, Mono- und Diglyceride.
Der Reaktionsablauf kann also durch mehrere Reaktionsschritte hindurch verfolgt werden. Daher finden sich auch in der Li-

teratur unterschiedliche Bestimmungsmethoden.

III.2.b.1. Methode nach DOLE

Die freigesetzten freien Fettsäuren werden durch das Titrationsverfahren nach DOLE (41) in der Modifikation nach TROUT (42) unter Verwendung von Nilblau A als Indikator bestimmt.

Die in Heptan extrahierten freien Fettsäuren werden mit wäßriger NaOH titriert; hierbei bildet sich ein Zwei-Phasen--System aus Heptan und Wasser, das durch durchströmendes N_2 gemischt werden muß. Hierbei ist der Umschlagspunkt des Indikators von blau auf rot nur schwer zu erkennen.

III.2.b.2. Methode nach BURNS

Auch bei der Methode nach BURNS (43) wird im Zwei-Phasen--System titriert, welches, wie oben bereits angeführt, einen erheblichen Unsicherheitsfaktor birgt.

III.2.b.3. Glycerinmessung nach Boehringer-Test

In dieser Arbeit wurde die LPA durch die freigesetzte Menge Glycerin gemessen mit dem TC-GL-Test Nr. 15989 von Boehringer Mannheim. Als Reaktionsprinzip gilt nach EGGSTEIN und KREUTZ (44)

1. Glycerin + ATP $\xleftrightarrow{\text{Glycerokinase}}$ L-Glycero-1-phosphat + ADP
2. ADP + Phosphoenolpyruvat $\xleftrightarrow{\text{Pyruvatkinase}}$ ATP + Pyruvat
3. Pyruvat + $NADH_2$ $\xleftrightarrow{\text{Lactatdehydrogenase}}$ Lactat + NAD

---

4. Glycerin + Phosphoenolpyruvat
   $\downarrow\uparrow$
   L-Glycerin-1-phosphat + $NADH_2$

Das hierbei entstandene $NADH_2$ ist die Meßgröße und aufgrund seiner Absorption bei 366 nm leicht zu bestimmen. Nach EGG-

STEIN (45) handelt es sich um eine bisher nicht erreichbare Empfindlichkeit und Richtigkeit bei enfachem methodischem Ansatz. In der vorliegenden Arbeit wurde daher diese Methode angewendet.

III.2.c. Berechnung der LPA in Plasma und Gewebe

Die LPA wurde unter Berücksichtigung des Leerwertes im Postheparinplasma und im Gewebe in µm Glycerin/g Protein/h berechnet.

III.2.d. Proteinbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Biuret-Methode verwendet.
Zu 5 ml Biuretreagenz wurden 0,1 ml Plasma bzw. Organhomogenat und 4,9 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben.
Dieser Ansatz bleibt 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen.
Danach wurde am Photometer die Extinktion bei 546 nm und einer Schichtdicke der Küvette von 2 cm gegen den Leerwert gemessen.
Ansatz des Leerwertes:

5,0 ml Biuretreagenz
5,0 ml Physiologische Kochsalzlösung

Der Eiweißgehalt errechnet sich aus der Extinktionsdifferenz Δ_E x 17,3 = g Eiweiß/100 ml Plasma bzw. 100 ml Organhomogenat.

IV. ERGEBNISSE

IV.1. Überprüfung der Methodik

IV.1.a. Einfluß von Nembutal^{R}

Vergleichende Untersuchungen der Enzymreaktionen bei Kaninchenplasma vor und nach Narkotikumgabe zeigten, daß Nembutal^{R} weder den enzymatischen Reaktionsablauf der LPA noch den enzymatischen Reaktionsablauf des TC-GL-Testes beeinflußt.

IV.1.b. Einfluß von Polyvinylalkohol

Als Voraussetzung für die verwendete Versuchsanordnung galt auch die Prüfung, ob Polyvinylalkohol die Enzymreaktion bei der Glycerin-Bestimmung hemmt; das Ergebnis war beim Versuch mit Postheparinplasma von Kaninchen negativ.

IV.1.c. Prüfung der Eigenschaften der LPA

pH-Messungen im Glycerin-Bestimmungsansatz ohne Plasma ergaben einen pH-Wert von 7,6. Die pH-Werte im Glycerin-Bestimmungsansatz nach Zugabe von Postheparinplasma von Kaninchen bzw. Homogenat nach abgestopptem Enzymreaktionsablauf ergaben je nach Organ Werte zwischen 7,50 und 7,54; somit ist das pH--Optimum beim Reaktionsablauf der Glycerin-Bestimmungsmethode annähernd erreicht.

Es wurde die Reaktionsgeschwindigkeit beim TC-GL-Test nach Zugabe von Suspension 3 untersucht. Die Extinktionswerte wurden alle 2 Minuten über 24 Minuten lang in Plasma, Herz und Leber gemessen.

Aus der Verlaufskurve der Enzymreaktion (siehe Abbildung 1) wurde ersichtlich, daß jeweils sofort nach Ablesen vom 1. Extinktionswert Suspension 4 zugegeben werden muß.
Bei der Substratauswahl zeigte eine Intralipidsuspension

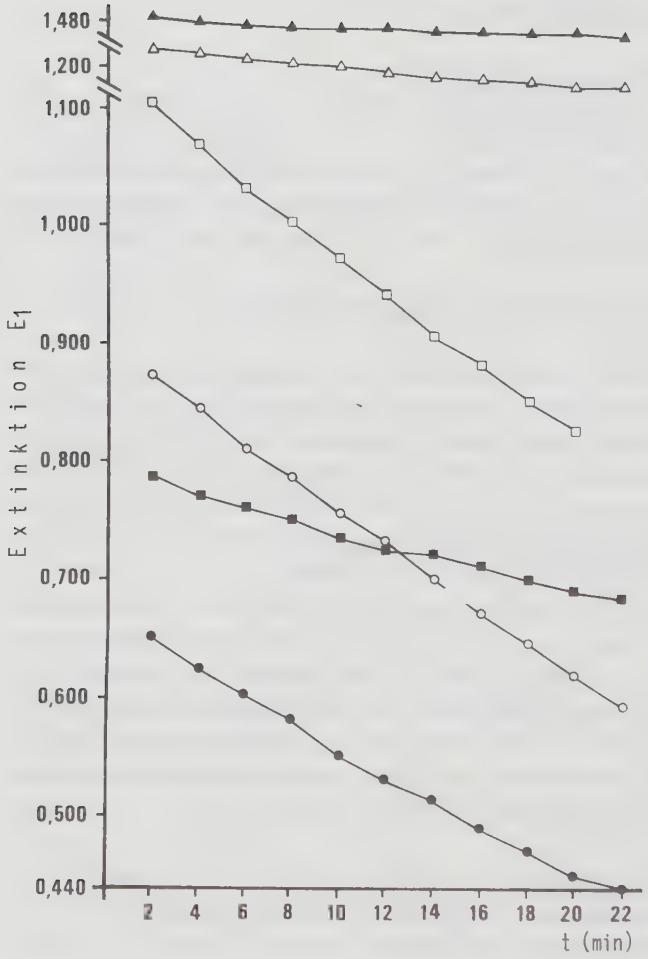

Abb. 1: Reaktionsgeschwindigkeit beim TC-GL-Test nach Zugabe von Suspension 3 zur Bestimmung des Glyceringehaltes im Homogenat verschiedener Organen und im Serum von Kaninchen

▲ = Serum
■ = Herz
● = Leber
△ = Leerwert Serum
□ = Leerwert Herz
○ = Leerwert Leber

(Vitrium^{R} = fraktioniertes Sojaöl) einen so hohen Gehalt an freiem Glycerin, daß die anfänglichen Versuche abgebrochen wurden. Auch Olivenöl als Substrat, 2 %ig in Aqua dest. emulgiert, konnte nicht verwendet werden, da sich beim Zentrifugieren das Öl vollständig an der Oberfläche absetzte.
Eine 2 %ige Sesamölemulsion war nicht geeignet, da keine klare Lösung entstand. Deshalb wurde Kokosfett in Form von Palmin-Tafelfett verwendet.

Aktivitätsverlust durch Einfrieren von Postheparinplasma bei Kaninchen ergab sich durch vergleichende Untersuchungen nicht.

IV.2. LPA in Organen

Da die lipolytische Aktivität in Organen (z.B. Leber) durch Heparin nicht stimuliert wird, konnten zu diesen Ansätzen sowohl heparinisierte als auch nicht heparinisierte Tiere verwendet werden.
LPA in Aorta:
Bei einem Verdünnungsfaktor von 1:40 bei Rattenaorta konnte keine Aktivität mehr gemessen werden. Das Homogenat wurde bei weiteren Versuchen mit Ratten aus einem Pool von 3 - 4 Tieren hergestellt. Ein Verdünnungsfaktor von 1:10 reichte dann aus zur Homogenatherstellung, jedoch war eine Aktivitätsmessung der LPA auch bei dieser Versuchsanordnung nicht möglich, da keine ausreichende Homogenisierung erreicht werden konnte; die elastischen Anteile des Aortengewebes wurden durch den Ultra-Turrax nicht genügend fein verteilt.

Bei der Herstellung von Aortenhomogenat von Kaninchen wurde versucht, die Homogenisierungsmethode weiter zu verbessern. Es sollte verhindert werden, daß die elastischen Anteile sich in den Messern des Ultra-Turraxgerätes verfingen; deshalb wurde die gesamte tiefgefrorene Aorta mit Kohlensäureschnee gehärtet, und dann wurden im Kryostat 50 µ starke Schnitte angefertigt. Diese wurden dann im Ultra-Turrax mit entsprechender Menge an physiologischer NaCl-Lösung 25 Sekunden un-

ter Kühlung homogenisiert.
Jedoch konnte auch im Aortenhomogenat von Kaninchen trotz dieser verbesserten Homogenisierungsmethode keine Aktivität der LPA gemessen werden.

IV.3. Untersuchungen der LPA bei Nikotinzufuhr

IV.3.a. Wirkung von Nikotin auf die Enzyme der Glycerin-Bestimmungsmethode

Bei der Glycerin-Bestimmungsmethode von Boehringer werden drei Hilfsenzyme verwendet: Glycerokinase, Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase. Um einen möglichen Nebeneffekt des Nikotins auf diese Enzyme zu sehen, wurde das Reaktionsgemisch unter Zusatz von Nikotin untersucht. Nikotin wurde in einer Konzentration von 10^{-3} m verwendet und in physiologischer NaCl-Lösung angesetzt.

IV.3.a.1. Ansatz mit Nikotin und Palminsubstrat

Im Ansatz der Glycerin-Bestimmungsmethode wurde anstatt 0,5 ml Enzymansatzlösung aus der abgestoppten LPA-Reaktion 0,5 ml 10^{-3} m Nikotinlösung verwendet, im Leerwertansatz 0,5 ml physiologische NaCl-Lösung. Zu beiden Ansätzen wurden außerdem noch 0,1 ml Palminsubstrat zugegeben.

IV.3.a.2. Ansatz mit Nikotin und Glycerinlösung

Anstatt 0,5 ml Enzymansatz aus der abgestoppten LPA-Reaktion wurden 0,5 ml einer 12,3 mg/100 ml Glycerinlösung verwendet, in dieser war außerdem Nikotin in einer Konzentration von 10^{-3} m enthalten; im Leerwertansatz anstatt 0,5 ml Enzymansatz 0,5 ml der 12,3 mg/100 ml Glycerinlösung.

IV.3.b. In vitro-Versuch mit Organen von Ratten und Kaninchen

Beim in vitro-Versuch wurde Nikotin in den Enzymreaktionsan-

satz gegeben.
Als Lösungsvermittler für das Nikotin wurden die Pufferlösung und Albuminlösung getestet. Es wurden Nikotinkonzentrationen von 10^{-2} bis 10^{-8} m pro 2 ml Enzymansatz verwendet. Als Homogenat dienten bei den Versuchen mit Ratten Herzmuskelgewebe und Leber.
Bei den Kaninchen wurde nur die Nikotinwirkung auf Herzen geprüft.
Verdünnungsfaktoren bei Rattenherzhomogenat und Kaninchenherzhomogenat waren jeweils 1:6.

IV.4. Untersuchung der LPA nach Berauchung

Eine typische German-blend-Zigarette wurde verwendet. Ausgetrocknete Zigaretten wurden im Exsikkator auf einen normalen Feuchtigkeitsgehalt gebracht. Die Zigaretten wurden jeweils bis zu einer Stummellänge von 23 mm abgeraucht.

IV.4.a. Wirkung von Tabakrauch auf die Enzyme der Glycerin--Bestimmungsmethode

40 ml einer physiologischen NaCl-Lösung mit einem Glyceringehalt von 6,5 mg/100 ml wurden in einer Gaswaschflasche mit Fritte dem Tabakrauch ausgesetzt unter gleichzeitiger Kühlung in einem Eiswasserbad. Mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einem T-Rohr wurde eine Zigarette abgeraucht. Die Fritte diente zur besseren Rauchverteilung in der Gaswaschflasche. Pro Minute erfolgte ein Zug von 2 Sekunden Dauer, anschliessend wurde die Gaswaschflasche zur besseren Verteilung und Lösung des Rauches leicht geschüttelt. Die konstante Stummellänge von 23 mm war durchschnittlich nach 11 Zügen erreicht. Für den Leerwert wurde die Glycerinlösung vor Berauchen verwendet.

IV.4.b. Berauchen in vitro von Organhomogenaten von Kaninchen

Zum Berauchen von Organen in der Gaswaschflasche mit Fritte werden verhältnismäßig große Homogenatmengen benötigt. Es wurde deshalb auf eine Versuchsserie mit Ratten verzichtet, sämtliche Untersuchungen wurden nur mit Kaninchenorganen durchgeführt.
Homogenate wurden, wie bereits beschrieben, hergestellt: aus Herz, der gesamten Aorta (nach verbesserter Homogenisierungsmethode) und Leber. Der Verdünnungsfaktor für Leberhomogenat betrug 1:10 und 1:4 (46).

Es wurden jeweils 20 ml Homogenat beraucht. Für den Wert von 0 Zigaretten wurde für 10 Minuten lang nur Luft durch die Gaswaschflasche geleitet. Es wurden maximal 5 Zigaretten pro Versuchsansatz geraucht. Beraucht wurden Herz- und Leberhomogenat.

IV.4.c. Berauchen in vivo

Es wurden insgesamt 10 Kaninchen eingesetzt. Unter Nembutalnarkose wurden die Tiere nach Tracheotomie intubiert und maschinell beatmet. Es wurden 10 - 11 Beatmungen pro Minute mit einem Volumen von 20 ml durchgeführt.
Beatmungsanordnung siehe Abbildung 2: Der Zigarettenrauch wird in die Rauchmaschine bei geschlossenem Dreiwegehahn gezogen.
Bei geöffnetem Hahn geht der Rauch aus der Pumpe in die Atemwege mit Hilfe des Beatmungsgerätes. Beim Inspirationszug wird der Rauch durch den geöffneten Dreiwegehahn mit in die Inspirationsluft zugelassen. Nach jedem Atemzug Zigarettenrauch folgen 2 - 3 Züge Frischluft. Das Frischluftvolumen wurde jedesmal erhöht, damit das gesamte Rauchvolumen in die Atemwege gelangte. Es wurden bis zu 6 Zigaretten geraucht; pro Zigarette zwischen 28 und 30 Züge zu je 20 ml Rauchvolumen in 6 1/2 - 7 Minuten.
Alle Tiere wurden nach dem Versuch unverzüglich entblutet,

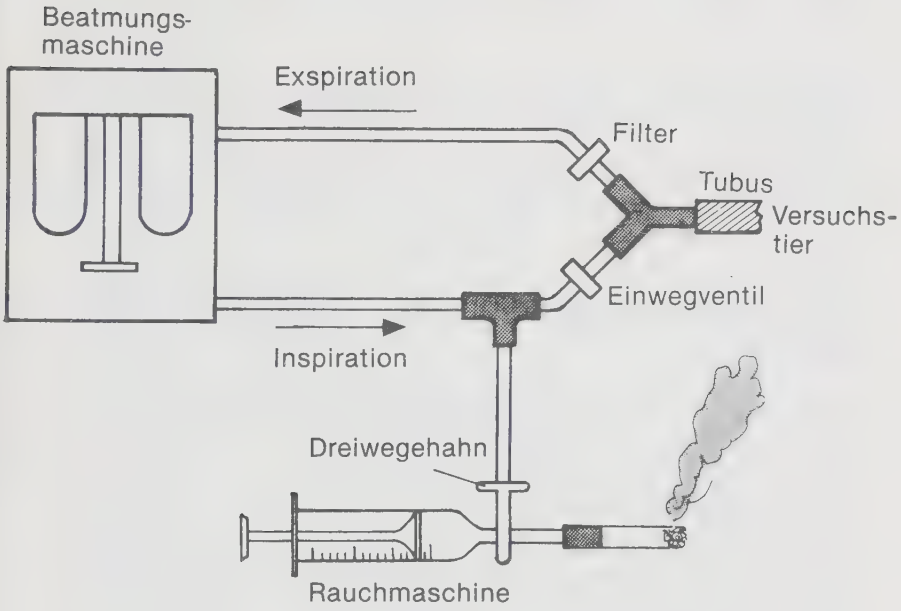

Abb. 2: Versuchsanordnung bei Berauchung in vivo

das Herz herauspräpariert und wie bei den vorangegangenen Versuchen weiter aufbereitet.

IV.5. Messungen der LPA bei Nikotinzufuhr in vitro

IV.5.a. pH-Optimum der Reaktion

Durch starke Änderung des pH-Optimums kann man eine scheinbare Hemmung erzeugen. Es ergaben sich sowohl bei Albumin als auch bei Puffer als Lösungsvermittler für Nikotin keine pH-Wert--Verschiebungen im Enzymansatz.
Auch die pH-Messungen im Glycerin-Bestimmungsansatz nach Zugabe von Nikotin entsprachen dem pH-Optimum der Reaktion.

IV.5.b. Verhalten von Nikotin zu Enzymen der Glycerinbestimmung

In der Nikotinlösung bzw. in der reinen Kochsalzlösung betrug der Glyceringehalt der zum Ansatz zugegebenen 0,1 ml Palminsubstratlösung 0,288 bzw. 0,2975 mg/100 ml Glycerin. Der Glyceringehalt nach der Bestimmungsmethode stimmte mit den vorgegebenen 12,3 mg/100 ml-Lösungen überein. Nikotin hemmt also die Glycerin-Bestimmungsenzyme nicht.

IV.5.c. Dosisabhängigkeit von Nikotin in Lösungsmitteln am Kaninchenherz

Dieser Versuch wurde durchgeführt zur Prüfung, ob eine eventuell bestehende Nikotinwirkung nicht geschwächt wird durch Bindung von Nikotin an Albumin oder Puffer im Versuchsansatz der enzymatischen Reaktion.
Von einem Tier wurden Doppelbestimmungen sowohl in der Nikotin-Albumin-Konzentrationsreihe als auch in der Nikotin-Puffer-Konzentrationsreihe gemacht. Wie aus Abbildung 3a und 3b ersichtlich, zeigten sich ähnliche Verlaufskurven der LPA am Kaninchenherzhomogenat. Eine Bindung von Nikotin an Albumin bzw. Puffer ist daher auszuschließen.

IV.5.d. LPA bei Kaninchenherzen

Die Messungen wurden am Herzhomogenat von insgesamt 5 Kaninchen durchgeführt. Wie aus den graphischen Darstellungen in Abbildung 3 auch ersichtlich ist, zeigt Nikotin in vitro keine deutliche Änderung der LPA am Herzen.

IV.5.e. LPA bei Rattenleber

Eine deutliche Beeinflussung der LPA durch Nikotin an Leberhomogenat von Ratten war nicht zu erkennen.

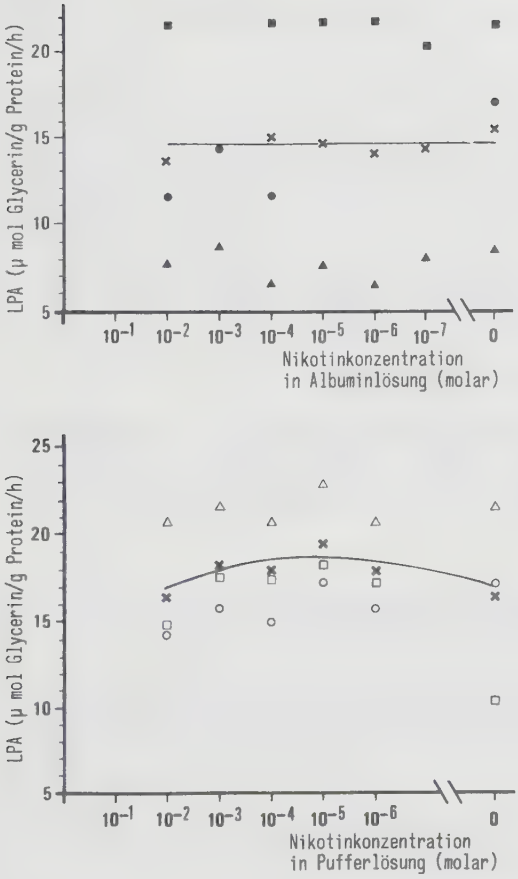

Abb. 3: Einfluß von Nikotin in verschiedenen Konzentrationen und unterschiedlichen Lösungsmitteln auf die LPA in Homogenaten mehrerer Kaninchenherzen

3a: Nikotinkonzentration in Albuminlösung
● = Herz K 1
▲ = Herz K 2
■ = Herz K 3

3b: Nikotinkonzentration in Pufferlösung
○ = Herz K 1
△ = Herz K 5
□ = Herz K 8

x = numerischer Mittelwert

IV.6. LPA-Messungen bei Berauchung in vitro

IV.6.a. Verhalten von Tabakrauch zu den Enzymen der Glycerinbestimmung

Durch Berauchen wurde das pH-Optimum von 7,6 nicht beeinträchtigt. Sowohl die reine Glycerin-Kochsalzlösung als auch die berauchte Glycerin-Kochsalzlösung enthielten bei jeweils dreifacher Reaktionsbestimmung immer den gleichen Glyceringehalt.
Rauchbestandteile hemmen also die Bestimmungsenzyme Glycerokinase, Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase nicht.

IV.6.b. LPA der Leber bei Berauchung

Die Werte vor Berauchung und die Werte bis zu 5 Zigaretten lagen zwischen 2,23 und 2,875 µm Glycerin/g Protein/h.
Es kann also nicht von einer Aktivitätsänderung gesprochen werden.

IV.6.c. LPA des Herzens bei Berauchung

Es wurden von insgesamt 5 Kaninchen jeweils ein Herzhomogenat beraucht. Wie in Abbildung 4 graphisch dargestellt, zeigte sich eine deutliche Hemmung der LPA bei Berauchung bis zu 5 Zigaretten.

IV.7. LPA-Messungen bei Berauchung in vivo

Alle 10 Kaninchen zeigten bei der 1. Zigarette über mehrere Züge lang eine Nikotinreaktion in Form von Tachykardie und Verkrampfung. Bei drei Tieren bestand bei der 4. bzw. 5. Zigarette über kurze Zeit eine Gegenatmung.
Bei einem Kaninchen mußte der Versuch nach 4 1/2 Zigaretten abgebrochen werden wegen Herzstillstand. Ein Kaninchen überlebte nur 1 Zigarette.
Es zeigte sich eine deutliche Aktivitätsänderung der LPA bei

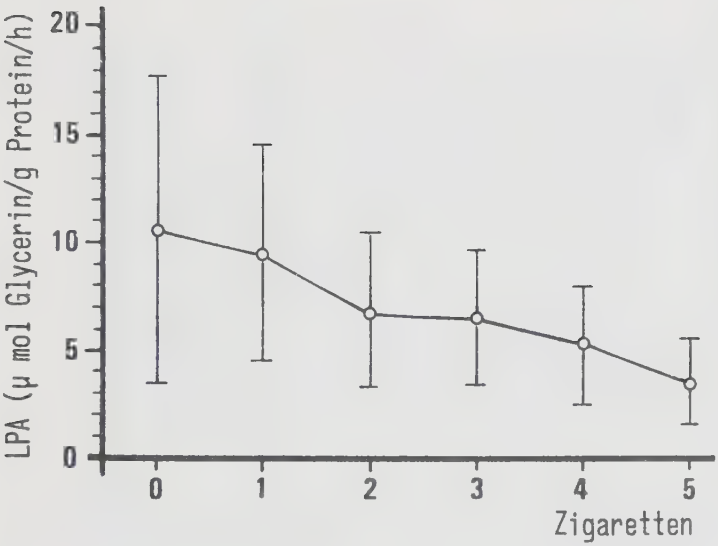

Abb. 4: LPA-Änderung bei Berauchung von Homogenaten mehrerer Kaninchenherzen

$\bar{x} \pm S$ n = 5

Berauchen von Kaninchen, gemessen an Herzhomogenaten, die in Tabelle 2 zusammengestellt und in Abbildung 5 graphisch dargestellt wurde.

Die außergewöhnlich reagierenden Tiere, die vorzeitig durch Exitus ausgeschieden sind, wurden aus der graphischen Darstellung herausgenommen.

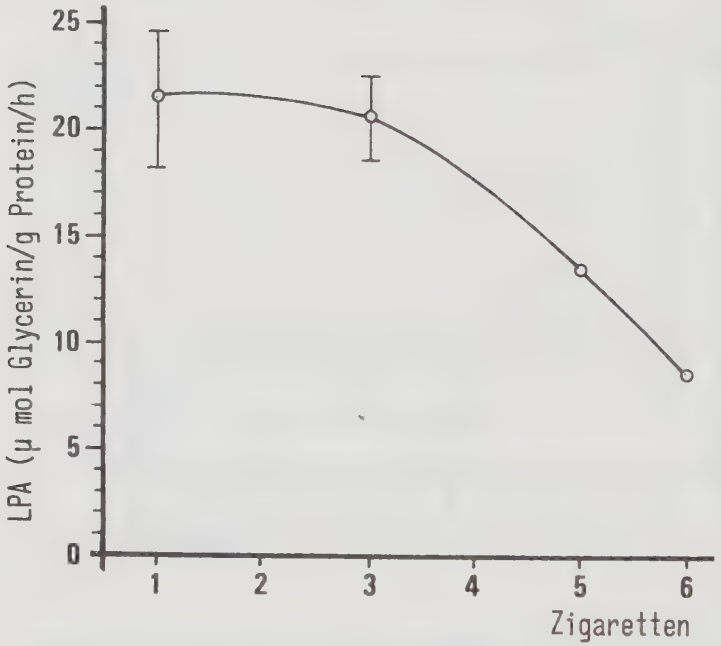

Abb. 5: LPA-Änderung gemessen am Herzen bei Berauchung mehrerer Kaninchen

$\bar{x} \pm S$ $\quad n = 7$

Tabelle 2: LPA am Kaninchenherz durch Berauchen in vivo

	Versuchstier Nr.	Mittelwerte	Gesamt-Mittelwerte	Bemerkung zum Versuchsablauf
1 Zigarette	K 16	15,34		ständige Gegenatmung, Exitus nach der 1. Zigarette
	K 21	19,11	19,36	normaler Versuchsablauf
	K 22	23,625		normaler Versuchsablauf
3 Zigaretten	K 18	18,6		normal (leicht verfettetes Herz)
	K 19	21,85	20,63	normaler Versuchsverlauf
	K 20	21,45		normaler Versuchsverlauf
4 1/2 Zigaretten	K 14	10,49		Exitus
5 Zigaretten	K 15	16,52	14,96	Exitus (verfettetes Herz)
	K 17	13,41		bei der 4. Zig. Gegenatmung für kurze Zeit, nach der 5. Zig. Exitus
6 Zigaretten	K 13	8,565		normaler Versuchsverlauf
Inhibitor		4,35		Zugabe von 0,3 m NaCl als Inhibitor der Enzymaktivität

V. DISKUSSION

Da die Neutralfett spaltende Aktivität der Organe nicht durch Heparin induzierbar ist und nicht auszuschließen ist, daß mehrere esterolytische Enzyme an der Triglyceridspaltung beteiligt sind, ist die gemessene Enzymaktivität als lipolytische Aktivität bezeichnet.
Aus den in vitro-Versuchen geht hervor, daß Nikotin, selbst in hohen Dosen, die Aktivität der lipolytischen Aktivität des Herzens, der Leber und des Fettgewebes nicht beeinflußt. Ausgiebige Vorversuche zur Methodik haben bewiesen, daß diese Beobachtung nicht auf eine Einwirkung des Alkaloids auf die verwendete enzymatische Bestimmungsmethode, z.B. durch eventuelle Gegenreaktionen, beruht. Durch diese methodischen Vorversuche, die einen erheblichen Teil dieser Arbeit darstellen und damit eine wesentliche Voraussetzung für die Beurteilung der Ergebnisse liefern, wurde die Überlegenheit der enzymatischen Glycerin-Bestimmungsmethode gegenüber älteren Methoden zur Erfassung der freigesetzten Fettsäuren eindeutig erwiesen.

Das Fehlen eines Einflusses von Nikotin auf die untersuchte lipolytische Aktivität und damit auf esterolytische Enzyme kann nicht überraschen. Diese Beobachtung bestätigt die Tatsache, daß das Alkaloid trotz seiner ausgeprägten pharmakologischen Aktivität keinen Einfluß auf Enzymaktivitäten ausübt. Dies wurde z.B. durch die Untersuchungen von SCHIEVELBEIN u. Mitarb. (46, 47) am Beispiel der am Tryptophanstoffwechsel beteiligten Enzyme nachgewiesen. Die in der Einleitung beschriebenen Versuche der Arbeitsgruppe Schievelbein, die eine erhebliche Steigerung der lipolytischen Aktivität nach chronischer Nikotinzufuhr bei Kaninchen zeigten, stehen aber offenbar nur scheinbar im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Wie bereits erwähnt, wirkt Nikotin indirekt auf die Lipolyse über die Freisetzung von Catecholaminen und damit über die Aktivierung des Adenylcyclasesystems. Es überrascht daher nicht, daß Nikotin in Organhomogenaten

keine Wirkung ausübt.

Im Gegensatz zu dem Fehlen der Wirkung des reinen Nikotins ist nach Berauchung von Homogenaten aus Kaninchenherzen eine deutliche Hemmung der lipolytischen Aktivität zu erkennen (Abb. 4) und zwar in Abhängigkeit von der Dosis.
Im Tabakrauch sind bereits nahezu 1000 Verbindungen nachgewiesen und identifiziert worden. Die Konzentration der einzelnen Bestandteile schwankt in weiten Grenzen. Jedoch kommen Verbindungen, von denen bekannt ist, daß sie enzymatische Reaktionen hemmen, in verhältnismäßig hoher Konzentration im Tabakrauch vor, so z.B. Kohlenmonoxid und HCN. Eine Abklärung, welche Bestandteile des Rauches für die Hemmung der lipolytischen Aktivität in Organhomogenaten verantwortlich sind, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

Die Hemmung der lipolytischen Enzyme, die in vitro beobachtet wurde, konnte auch nach Berauchung von Versuchstieren in vivo nachgewiesen werden (Abb. 5). Die Wirkung der im Rauch vorhandenen Inhibitoren muß also außerordentlich wirksam sein, außerdem müssen sie in genügender Konzentration aus dem Rauch resorbiert werden. Für die Frage der Identifizierung gilt entsprechend das im vorhergehenden Abschnitt gesagte.

Es ist bisher nicht gelungen, bei Versuchstieren durch Berauchen eine der Arteriosklerose des Menschen entsprechende Veränderung von Gefäßen hervorzurufen. Dies liegt vornehmlich an technischen Schwierigkeiten, trotzdem müssen die statistisch-epidemiologischen Korrelationen zwischen dem inhalierenden Rauchen und dem Auftreten von Herz-Kreislaufkrankheiten vom Standpunkt der Präventivmedizin als gegeben hingenommen werden, zumal in neueren Untersuchungen eine Verminderung der Erkrankungshäufigkeit nach Einführung "leichterer" Zigaretten in den USA erkennbar wird (Hammond) (48).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen jedoch, daß Nikotin allein

nicht in der Lage ist, die lipolytische Aktivität zu beeinflussen. Anders jedoch im lebenden Organismus, in dem eine deutlich gesteigerte Lipolyse nach chronischer Nikotinzufuhr zu beobachten war. Es gibt keinen Hinweis darauf, daß die durch die Zufuhr von Nikotin erhöhte Bildungsrate von freien Fettsäuren auch zu einer vermehrten Neubildung von Triglyceriden in der Leber aufgrund einer gesteigerten Veresterung führt. Es muß daher vor einer zu starken Reduktion des Nikotins in den Zigaretten gewarnt werden, da der Raucher sonst durch vermehrten Konsum von "leichteren", nikotinärmeren Zigaretten eine noch größere Menge von Substanzen aufnimmt, die ebenso gesundheitsschädlich sind wie das Nikotin. Vor gesundheitsschädlichen Substanzen sollte er jedoch generell geschützt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Hinblick auf die statistisch-epidemiologischen Korrelationen zwischen Coronarsklerose und Zigarettenrauchen wird die Wirkung von Tabakrauch und Nikotin auf die lipolytische Aktivität von Plasma und Organhomogenaten bearbeitet.

   Dabei wird an frühere Untersuchungen angeschlossen, die bei chronischer Nikotinzufuhr eine Steigerung der Aktivität der fettspaltenden Enzyme zeigten.

2. In ausgedehnten Vorversuchen werden verschiedene Methoden zur Bestimmung der lipolytischen Aktivität geprüft und als zuverlässigste Methode die enzymatische Bestimmung des Glycerins erkannt. Durch Zusatzversuche mit Nikotin wird sichergestellt, daß Nikotin keinen Einfluß auf die verschiedenen Reaktionsschritte der Methode ausübt.

3. Die lipolytische Aktivität im Homogenat von Kaninchenherzen wird durch den Zusatz von Nikotin bis zu einer Konzentration von 10^{-2} m nicht beeinflußt.

4. Das Hindurchleiten von Zigarettenrauch durch Organhomogenate hemmt die lipolytische Aktivität in Abhängigkeit von der Dosis.

5. Die lipolytische Aktivität der Organe von Versuchstieren nach aktiver Berauchung ist dosisabhängig gehemmt.

6. Im Hinblick auf frühere Untersuchungsergebnisse wird geschlossen, daß Nikotin den Fettstoffwechsel über eine Einwirkung auf lipolytisch wirkende Esterasen nicht beeinflußt, daß jedoch andere Tabakrauchbestandteile die an der Lipolyse beteiligten Enzyme hemmen können.

7. Die Ergebnisse werden im Hinblick auf die Befunde anderer Autoren und die statistisch-epidemiologischen Korrelatio-

nen zwischen Herz- und Kreislauferkrankungen und Zusammensetzung des Tabakrauches diskutiert. Es wird gewarnt, den Nikotingehalt von Zigaretten drastisch zu senken, um den Raucher nicht zu verstärktem Konsum mit gesteigerter Aufnahme anderer Tabakbestandteile zu verleiten.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Smoking and Health — Report of the Advisory Committee of the Surgeon General of the Public Health Service. Public Health Service Publication No. 1103, Washington DC (Terry Report) (1964)

2. DOYLE, J.T.; T.R. DAWLER; W.B. KANNEL; S.H. KINCH; H.A. KAHN — J.Amer.Med.Ass. 190, 886 (1964)

3. DAWBER, T.R.; W.B. KANNEL — Circulation 34, 553 (1966)

4. GSELL, O. — in: H. SCHIEVELBEIN Nikotin, Pharmakologie und Toxikologie des Tabakrauches Thieme Stuttgart (1968)

5. SCHETTLER, G. — Vortrag Österr. Ärztekongress van Swieten-Tagung Wien 1968

6. WERLE, E.; H. SCHIEVELBEIN — Nature 107, 871 (1965)

7. SINGH, J.; Y.T. OESTER — Fed.Proc. 20, 168 (1961)

8. WENZEL, D.G.; J. SINGH — J.Pharm.Sci. 51, 875 (1962(

9. SHIMAMOTO, T. — ASIAN MED.J. 3, 479 (1960)

10. HESS, H.; H. FROST — Fortschr.Med. 86, 841 (1968)

11. LARSON, P.S.; H.B. HAAG; S. SILVETTE — Tabacco: Experimental and clinical studies. Williams and Wilkins, Baltimore (1961)

12. KERSHBAUM, A.; S. BELLET; E.R. DICKSTEIN; L.J. FEINBERG — Circulation Research 9, 631 (1961)

13. KERSHBAUM, A.; R. KHORSANDIAN; R.F. CAPLAN; S. BELLET; L.J. FEINBERG — Circulation Vol. XXVIII, 52 (1963)

14. KERSHBAUM, A.; S. BELLET; J. JIMINEZ — J.Amer.Med.Ass. 195, 1095 (1966)

15. KERSHBAUM, A.; J. JIMINEZ; S. BELLET; D. ZANUTTINI — J.Atheroscler.Res. 6, 524 (1966)

16. HANSSON, E.; C.G. SCHMITTERLÖW — J.Pharm.exp.Therap. 137, 1 (1962)

17. SCHIEVELBEIN, H. — in: H. SCHIEVELBEIN Nikotin, Pharmakologie und Toxikologie des Tabakrauches. Thieme Stuttgart (1968)

18. WESTERMANN, E. — Fette in der Med. 7, 8 (1965)

19. SCHLIERF, G.; W. KAHLKE — Fettstoffwechsel in: Klinische Pathophysiologie hrsg. W. SIEGENTHALER Thieme Stuttgart 1970

20. CARLSON, L.A.; J. BOBERG; B. HÖGSTEDT — in: Handbook of Physiology, Section 5, Adipose Tissue, hrsg. A.E. Renold; G.F. Cahill Amer.Physiol.Soc. (1965)

21. GOFMAN, J.W.; F.T. LINDGREN; B. STRISOWER; O.F. DELALLA; F. GLAZIER; A. TEMPLIN — Geriatrics Minneapolis 10, 349 (1955)

22. KARVONEN, M.; E. ORMA; A. KEYS; F. FIDANZA; J. BROZEK — Lancet 1959/I, 492

23. BRONTE-STEWART, B. — Brit.Med.J. 1961/I, 379

24. THOMAS, C.B. — J.chron.Dis. 7, 198 (1958)

25. KANNEL, W.B.; L.K. WIDMER; T.R. DAWBER — Schweiz.med.Wschr. 95, 18 (1965)

26. WENZEL, D.G.; G.L. BECKLOFF — J.Amer.Pharm.Ass. 57, 338 (1958)

27. BECKER, G.H.; H. NECHELES — Gastroenterology 14, 80 (1950)

28. WHITE, H.J.; I. GORE; B.I. LARKEY — Biochim.biol.speriment. 3, 107 (1964)

29. ANGERVALL, G.; B. GOOD — Acta med.Scand. 157, 407 (1957)

30. ANTONINI, F.M.; L. SALVINI — Bull.Schweiz.Acad.Med.Wiss. 13, 209 (1957)

31. HASS, G.M.; W. LANDERHOLM; A. HEMMENS — Circulation 34, 739 (1966)

32. GROSGOGEAT, Y.G.; G. ROUBELAKIS — Pathol.Biol. 13, 1140 (1965)

33. GROSGOGEAT, Y.G.; G. ANGUERA; J. LELLOUCH; B. JACOTOT; J.-L. BEAUMONT — J.Atheroscler.Res. 5, 291 (1965)

34. SCHIEVELBEIN, H. — Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 8, 190 (1970)

35. SCHETTLER, E.; Y. GOTO; Y. HATH; G. KLOSE — in: Atherosclerosis IV 167 (1977) hrsg. Springer-Verlag Berlin-Heidelberg

36. HAM, J.M.; W.W. SLACK — Clin.Chim.Acta 25, 418 (1969)

37. SCOTT, R.F.; R.A. FLORENTIN; A.S. DAOUD; E.S. MORRISON; R.M. JONES; M.S.R. HUTT — Experimental and molecular Pathology 5, 13 (1966)

38. SAILER, S.; F. SANDHOFER; H. BRAUNSTEINER — Klin.Wschr. 39, 585 (1961

39. LONDONG, W. — Dissertation München 1971

40. KORN, E.D. J.Biol.Chem 215, 2 (1955)

41. DOLE, V.D. J.Clin.Invest. 35, 150 (1956)

42. TROUT, D.L.; E.L. ESTES; S.J. FRIEDBERG J.Lip.Res. 1, 199 (1960)

43. BURNS, T.W.; C.W. GEHRKE; M.J. AUIGIAN; P.E. LANGLEY J.Lab.Clin.Med. 62, 646 (1963)

44. EGGSTEIN, M.; F.H. KREUTZ Klin.Wschr. 5, 262 (1966)

45. EGGSTEIN, M. Klin.Wschr. 5, 267 (1966)

46. GRUMBACH, H. Dissertation München 1968

47. SCHIEVELBEIN, H.; H. GRUMBACH J.Krebsforschg. 70, 48 (1967)

48. HAMMOND, E.C.; L. GARFINKLE; H. SEIDMAN; E.A. LEW in: World Smoking and Health Vol. 1, 40 (1976)

Herrn Professor Dr. H. Schievelbein danke ich für die Überlassung des Themas und für zahlreiche Anregungen und Diskussion bei der Durchführung der experimentellen Untersuchungen.

Für ihre freundliche Unterstützung danke ich den Mitarbeitern des Instituts, vor allem Frau Karin Löschenkohl.

LEBENSLAUF

Am 2.3.1944 wurde ich, Hildegard Pabst, geb. Gindele, in Mitterhart, Kreis Rosenheim, als drittes und jüngstes Kind von Georg Gindele und Elisabeth Gindele, geb. Ostermaier, geboren.

Nach dem Besuch der St. Anna-Volksschule in München von 1950 bis 1954 trat ich 1954 in die St. Anna-Oberrealschule in München ein, die ich bis zur 8. Klasse 1963 besuchte. 1964 legte ich die Reifeprüfung an der Gisela-Oberrealschule in München ab.

Im Wintersemester 1964 begann ich in München mit meinem Medizinstudium und bestand im September 1971 an der Ludwig Maximilians-Universität München das medizinische Staatsexamen. Nach Ableistung der Medizinalassistentenzeit an der Chirurgischen Universitätsklinik München, an der Privatklinik Wolfart in Gräfelfing und an der Internen Abteilung des Kreiskrankenhauses Fürstenfeldbruck erhielt ich im Mai 1973 die ärztliche Approbation.

Als Assistenzärztin war ich tätig im Kreiskrankenhaus Fürstenfeldbruck, anschließend im Zweckverbandskrankenhaus Seefeld/Oberalting.

Seit dem 16.9.1971 bin ich mit dem Arzt Dr. Helmut Pabst aus München verheiratet und habe drei Kinder.

Hildegard Pabst